



TITLE:

酵母による褐藻糖質からのエタノール生産

AUTHOR(S):

河井, 重幸; 村田, 幸作

CITATION:

河井, 重幸 ...[et al]. 酵母による褐藻糖質からのエタノール生産. バイオサイエンスとインダストリー(B&I) 2017, 75(1): 42-43

ISSUE DATE:

2017-01-10

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/224992>

RIGHT:

発行元の許可を得て登録しています.; This is not the published version. Please cite only the published version.; この論文は出版社版ではありません。引用の際には出版社版をご確認ご利用ください。

出芽酵母による褐藻糖質からのエタノール生産
：現状と展望

Production of ethanol from brown macroalgal
sugars using *Saccharomyces cerevisiae*: current
status and perspectives

河井重幸、村田幸作

出芽酵母、褐藻、アルギン酸、マンニトール

はじめに

世界第6位という広大な管轄水域に恵まれた日本にとって、海洋バイオマス（海藻）は国内での大量養殖が可能な有望な未利用資源である。海藻は、緑藻、紅藻、および褐藻に大別できる。うち褐藻は藻体が巨大であり、海の森とも称される藻場を形成する、養殖法が確立されているなどの利点を有する。演者らは、特に褐藻の難利用性糖質（褐藻糖質：アルギン酸とマンニトール）を原料とした微生物（スフィンゴモナス属細菌 A1 株、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*）による有用化合物（エタノール、ピルビン酸）の生産に取り組んできた¹⁾²⁾。

本稿では、出芽酵母を宿主としたマンニトールからのエタノール生産に関する筆者らの成果³⁾を紹介すると共に、褐藻糖質（アルギン酸とマンニトール）からの出芽酵母によるエタノール生産に関しても国内外の現状と展望を紹介したい。

1. 出芽酵母によるマンニトールからのエタノール生産

出芽酵母は、安全、様々な知見や操作法が充実、大規模生産系などのインフラストラクチャーが整備、発酵力が強い、動植物など多様な生物種の外来遺伝子発現の優れた宿主たり得る、頑健性など多くの長所を有する優れた発酵微生物である。一方で、*Saccharomyces paradoxus* NBRC 0259 など一部の酵母はマンニトールを資化してエタノールを生産できるものの¹⁾、一般的には出芽酵母は褐藻糖質（アルギン酸、マンニトール）を資化できない。

そもそも、マンニトールはフルクトースが還元さ

れた糖アルコールであり、マンニトールデヒドロゲナーゼ（MDH）のはたらきによりフルクトースへと酸化される。この時、余剰還元力（ $\text{NADH} + \text{H}^+$ ）が生成する。出芽酵母のゲノムには MDH 遺伝子（*YEL070W YNR073C*）が存在するにも拘わらず、出芽酵母はマンニトールを資化できない。

著者らは、出芽酵母一倍体 BY4742 株（約5百万個）を、マンニトールを炭素源とする合成固体培地上に塗布して培養すると幾つかのコロニーが出現し（図1）、これらの中からマンニトール資化能を獲得した株（Mtl+株）が得られることを見出した³⁾。Mtl+株の幾つかはフロキュレーション（細胞同士の凝集）も示した。このマンニトール資化能獲得現象は他の出芽酵母一倍体株でも観察されたが、二倍体株では決して観察されなかった。フロキュレーション能の強い Mtl+株のエタノール生産性が低かったため、Mtl+株の中からフロキュレーション能の弱い MK3619 株と MK4416 株を選抜した。100g/L のマンニトールから両株共に 40 g/L のエタノールを生産した（図2）。また、MK4416 株の方が MK3619 株よりも優れた耐塩性を示した（図2）³⁾。耐塩性の高さは海藻糖質を利用する上で有用と考えられた。

さらに筆者らは、このマンニトール資化能の獲得は、Tup1-Cyc8 遺伝子への自然変異によることを明らかにした（図1）³⁾。例えば、MK4416 株は *cyc8 Δ1139-1164* アリールを有していた。Tup1-Cyc8 は転写コリプレッサー複合体を形成し、多くの遺伝子の転写制御に関わる。Tup1 の N 末領域の高次構造が明らかとなっている⁴⁾。MDH 遺伝子をはじめとするマンニトール資化に必要な遺伝子の発現を Tup1-Cyc8 が強固に抑制していると考えられた。

以上の成果は、出芽酵母一倍体株をマンニトール含有培地に塗布するのみでマンニトール資化能を獲得した非組み換え型の出芽酵母株を得られることを意味する。産業上、遺伝子組換えに頼らずに出芽酵母株にマンニトール資化能を付与したい場合に有用かもしれない。

2. 国内外の出芽酵母による褐藻糖質の利用研究

出芽酵母による褐藻糖質利用の研究報告例は現時点では限られており、上記筆者らの研究³⁾と Enquist-Newman らによる研究⁵⁾である。

マンニトール資化に関して、Enquist-Newmanらは、「マンニトールを効率的に資化できるようになった」出芽酵母株を得た後、マイクロアレー解析等によって、MDH 遺伝子 (*YNR073C*) と MFS トランスポーターホモログ遺伝子 (*HXT17*) がマンニトール資化に必須であり、両遺伝子を強制発現させることで出芽酵母にマンニトール資化能を付与できることを示した⁵⁾。

DEH (4-デオキシ-L-エリスロ-5-ヘキシセウロースウロン酸) は、アルギン酸をエキソ型アルギン酸リアーゼで分解することにより生成するモノウロン酸である。Enquist-Newmanらは出芽酵母への DEH 資化能の付与にも成功している⁵⁾。Enquist-Newmanらは、アルギン酸資化性の海洋性カビ *Asteromyces cruciatus* から同定された DEH 取り込み遺伝子ならびに他の DEH 資化に必要な 3 遺伝子を出芽酵母のゲノム DNA に挿入し、DEH を炭素源とする培地での適応進化等により DEH 資化能を獲得した出芽酵母株を得た⁵⁾。さらに、上記の *YNR073CHXT17* の強制発現により本株にマンニトール資化能も付与した⁵⁾。得られた株は、98 g/L の褐藻糖質 (DEH:マンニトール=モル比 1:2) から 36.2 g/L のエタノールを生産した⁵⁾。

おわりに

出芽酵母へのマンニトール資化能の付与方法に関しては、筆者らの方法³⁾と Enquist-Newmanらによる方法⁵⁾、どちらの方法が優れているかを検証する必要がある。アルギン酸資化能の付与に関しては、DEH とマンニトールのより強力な資化能を示す出芽酵母株、DEH でなくアルギン酸を資化できる出芽酵母株の構築が待たれる。DEH 培地での適応進化のメカニズム等、出芽酵母の褐藻糖質代謝には不明点が多い。筆者らもこれらの問題に取り組んでおり、別の機会に紹介できれば幸いである。

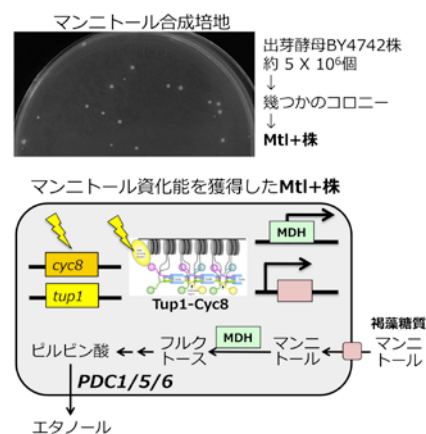


図1 マンニトール資化能の獲得

出芽酵母は Tup1-Cyc8 遺伝子への自然変異によりマンニトール資化能を獲得した Mtl+株となる (図中の Tup1-Cyc8 の模式図は文献⁴⁾より改変転載)

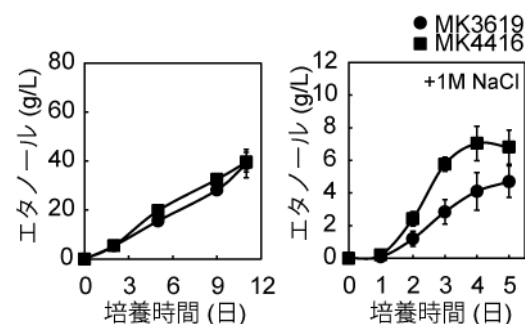


図2 Mtl+株によるエタノール生産

Mtl+株による 100 g/L マンニトール (左)、1 M NaCl 存在下での 20 g/L マンニトール (右) からのエタノール生産 (文献³⁾より改変転載)

参考文献

- 1) Kawai, S. *et al.* Biofuel production based on carbohydrates from both brown and red macroalgae: recent developments in key biotechnologies, *Int J Mol Sci* 17 (2016)
- 2) Kawai, S. *et al.* Bacterial pyruvate production from alginate, a promising carbon source from marine brown macroalgae, *J. Biosci. Bioeng.* 117, 269-274 (2014)
- 3) Chujo, M. *et al.* Acquisition of the ability To assimilate mannitol by *Saccharomyces cerevisiae* through

- dysfunction of the general corepressor
Tup1-Cyc8, *Appl. Environ. Microbiol.* 81,
9-16 (2015)
- 4) Matsumura, H. *et al.* Crystal structure
of the N-terminal domain of the yeast
general corepressor Tup1p and its
functional implications, *J. Biol. Chem.*
287, 26528-26538 (2012)
- 5) Enquist-Newman, M. *et al.* Efficient
ethanol production from brown
macroalgae sugars by a synthetic yeast
platform, *Nature* 505, 239-243 (2014)